

Oponentský posudek na magisterskou práci:

Funkce RAD18 v ubikvitinaci na místech dvouřetězcových DNA zlomů

Bc. Matouš Palek

Magisterská práce Bc. Matouše Palka se zaměřuje na důležitý obor, který popisuje, jak eukaryotické buňky organizují a regulují jednotlivé fáze opravy poškozené DNA. Specificky se Matouš Palek soustředil na studium ubikvitin ligázy Rad18 účastnící se opravy dvouřetězcových zlomů v DNA. Práce je rozdělena do třech částí. První část se věnuje funkční analýze mutací genu Rad18 identifikovaných u českých pacientů s nádorovými onemocněními. V druhé části se autor snaží popsat roli Rad18 během homologní rekombinace a v poslední části se soustředí na identifikaci mechanismu, jakým Rad18 rozeznává poškozenou DNA a zejména na spolupráci a antagonismus mezi Rad18 a 53BP1 proteinem.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Jedná se o nadprůměrnou diplomovou práci a to zejména obsahem a zpracováním. Autor vyseletoval pro první část své práce jedenáct mutantů identifikovaných v nádorech. Tyto mutace byly lokalizované do třech funkčních a strukturních oblastí RAD18 proteinu - RING (katalytické), UBZ domény a C-koncové oblasti. Srovnáním divoké formy Rad18 a mutantních forem pocházejících z nádoru došel autor k závěru, že mutace v C-koncové oblasti ovlivňovaly nukleární lokalizaci RAD18. Mutace lokalizované v UBZ doméně vedly k defektu v ubikvitinaci PCNA, lokalizaci do DNA zlomů a interakci s K63-polyubikvitinovými řetězci.

Otázky k této části:

1/ Proč jste ve své práci nevyužili mutant s delecí RING domény jako kontrolu k funkční analýze mutací lokalizovaných v této doméně?

2/ Ztráta RAD18 vede k výrazně snížené proliferaci po poškození DNA. Proč jste nevyužili proliferaci jako „readout“ aktivity jednotlivých mutantů?

3/ Zkoumali jste, jaký vliv může mít mutace v RING doméně (P70L) na trojrozměrnou strukturu RAD18? Jaký byste očekával?

V další části se Matouš Palek soustředil na analýzu RAD18 KO buněk a vliv této delece na funkci dalších komponent DNA opravné mašinerie. Podobně jako v první části pozoroval zvýšenou vazbu 53BP1 proteinu na poškozenou DNA. Naopak u proteinů účastnících se homologní rekombinace pozoroval sníženou koncentraci v místech poškození.

4/ Vzhledem k odlišné dynamice opravy DNA v RAD18 KO buňkách může docházet (a dochází) k výrazným změnám v posttranslačních modifikacích asociovaného chromatinu. Vy sám ukazujete zvýšenou polyubikvitinaci, ale může se jednat i o jiné epigenetické modifikace. Je možné, že RAD18 a 53BP1 spolu nekompetují o vazebné místo, ale

v důsledku výše zmíněných změn v epigenetické modifikaci poškozeného chromatinu dochází k silnější atrakci 53BP1 proteinu?

5/ Pro vaši práci jste využili pouze jeden klon KO a parentální buňky, které jsou pravděpodobně směsí různých klonů. Není možné, že odchylky, které pozorujete, jsou výsledkem náhodné klonální odlišnosti a ne důsledkem RAD18 absence? Jakým experimentem byste moji námitku vyvrátil?

V poslední části se autor soustředí na analýzu mechanismu vazby RAD18 na poškozenou DNA.

6/ GFP-RAD18 izolovaný z buněčné kultury bude pravděpodobně vázat množství dalších proteinů, které v důsledku povedou k nespecifické vazbě (např. neubikvitinovaného histonu). Zkoušeli jste připravit jiný typ rekombinantní RAD18 (např. z bakterií)?

7/ Jaké máte další plány v rámci vašeho výzkumu? Chcete se i nadále soustředit na RAD18?

Formální kvalita předloženého spisu

Formálně perfektní včetně doprovodných obrázků a tabulek. Vytkl bych absenci jakékoliv informace o tom, jak byly připraveny originální obrázky a schémata a jaké k tomu byly použity podklady (citace). Jestli byly převzaty z jiných publikací? Jaký program byl použit k jejich produkci?

Jazyk

Práce je napsaná výbornou a srozumitelnou angličtinou. Jako oponent pokládám psaní diplomových prací v angličtině za něco, co by mělo být pravidlem a oceňuji tento krok.

Literární přehled

Literární přehled je důkladný a pokrývá celou tematiku, které se práce věnuje. Je napsán srozumitelně a obsahuje množství zjednodušujících a vysvětlujících schémat.

Materiál a metody

Jedná se o klasickou buněčně a molekulárně biologickou práci a tomu odpovídá i velmi bohaté spektrum metod. Ty jsou popsány srozumitelně a přehledně.

Výsledky

V této části autor prezentuje 10 kompozitních obrázků a tři v rámci suplementárních materiálů. Jedná se o velký objem dat, vesměs ve formě imunofluorescenčních obrázků a jejich analýzy. Všechny výsledky jsou na vynikající metodické úrovni v publikovatelné kvalitě.

Diskuse

Autor diskutuje dosažené výsledky v kontextu současného poznání této problematiky. V rámci diskuze je každý výsledek probírán do důsledku. Autor přináší možné vysvětlení paradoxních zjištění – jako např. zvýšená ubikvitinace chromatinu u RAD18 KO klonu. V závěru diskuse autor předkládá pracovní hypotézu soustředící se na potenciální roli SLF1 a RAD6 proteinů na funkci RAD18 ubikvitin ligázy. Tato hypotéza je doplněna schématem. I toto svědčí o autorově schopnosti plánovat budoucí experimenty a klást si cíle a otázky, které slouží k odhalení dosud nepopsaných buněčných mechanismů.

Dle názoru oponenta se jedná o vynikající diplomovou práci. Matouš Palek prokázal, že je schopen získat a analyzovat data na skvělé úrovni. Je to práce ambiciózní a je jisté, že je určena k publikaci.